

PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum)

1267

<b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b>	
METHOD OF ENHANCING SALTY TASTE, SALTY TASTE ENHANCER, SALTY TASTE SEASONING AGENT AND SALTY TASTE-ENHANCED FOODS	
<b>Box No. II APPLICANT</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan	<input type="checkbox"/> This person is also inventor.  Telephone No. 03-3282-0036  Facsimile No. 03-3282-1527  Teleprinter No.
State (that is, country) of nationality: JP	State (that is, country) of residence: JP
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
Shigenori Ohta  c/o Head Office, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan	This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
State (that is, country) of nationality: JP	State (that is, country) of residence: JP
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
<b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
	Telephone No.
	Facsimile No.
	Teleprinter No.
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	



Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)			
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>  Chiaki Saitoh  c/o Foods & Liquors Research Laboratories KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0398 Japan		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State (that is, country) of nationality: JP		State (that is, country) of residence: JP	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>  Hiroaki Iwasaki  c/o Foods & Liquors Research Laboratories KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0398 Japan		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State (that is, country) of nationality: JP		State (that is, country) of residence: JP	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>  Aki Nakagawa  c/o Foods & Liquors Research Laboratories KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0398 Japan		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State (that is, country) of nationality: JP		State (that is, country) of residence: JP	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>  (Empty)		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State (that is, country) of nationality:		State (that is, country) of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.			



**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be made):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other of protection or treatment desired, specify on dotted line)

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates                 | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda                  | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania                              | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia                              | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria                              | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia                            | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan                           | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina               | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados                             | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria                             | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil                               | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus                              | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize                               | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China                                | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica                           | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba                                 | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic                       | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany                              | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark                              | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica                             | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria                              | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia                              | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain                                | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland                              | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom                       | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada                              | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia                              | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana                                | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia                               | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia                              | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania               |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary                              | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia                            | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel                               | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India                                | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland                              | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                                | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya                                | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe                                  |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea           |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan                           |  |

Check-box reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



**Supplemental Box**
*If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information; in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:
  - (i) if more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available; in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
  - (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked; in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
  - (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America; in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
  - (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents; in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
  - (v) if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part"; in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
  - (vi) if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed; in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI;
  - (vii) if, in Box No. VI, the earlier application is an ARIPO application; in such case, write "Continuation of Box No. VI", specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed.
2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement; in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.
3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty; in such case, write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below.

[Continuation of Box No. VI]

(4) Filing date of earlier application (day/month/year)	24.12.99
Number of earlier application	368059/99
national application: country	JP





<b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 29.11.99	338530/99	JP		
item (2) 29.11.99	338531/99	JP		
item (3) 24.12.99	368058/99	JP		
<input checked="" type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1), (2), (3), (4) * Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.				
<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>				
<b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b> (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / JP		<b>Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):</b> Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office)		
<b>Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING</b>				
This international application contains the following number of sheets: request : 5 description (excluding sequence listing part) : 37 claims : 3 abstract : 1 drawings : 0 sequence listing part of description : 0 Total number of sheets : 46		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify):		
<b>Figure of the drawings which should accompany the abstract:</b>		<b>Language of filing of the international application:</b> JP		
<b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>				
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.		Chiaki Saitoh	Aki Nakagawa	
Shigenori Ohta		Hiroaki Iwasaki		

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	



11

# TENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

JUN 18 2001

PCT

WPCJD

PLPJD

I.P. DEPT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence) PCLN

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:  
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 07 June 2001 (07.06.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 1267			
International application No. PCT/JP00/08391	International filing date (day/month/year) 29 November 2000 (29.11.00)	Priority date (day/month/year) 29 November 1999 (29.11.99)	
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AE, AG, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 07 June 2001 (07.06.01) under No. WO 01/39613

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38
Form PCT/IB/308 (July 1996)	



# PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/0839

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

## NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

WPAJD

RECEIVED

JAN 29, 2001

I. P. DEPT

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

21 December 2000 (21.12.00)

Applicant's or agent's file reference

1267

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/JP00/08391

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (for all designated States except US)  
OHTA, Shigenori et al (for US)

International filing date

Priority date(s) claimed

29 November 2000 (29.11.00)

29 November 1999 (29.11.99)

29 November 1999 (29.11.99)

24 December 1999 (24.12.99)

24 December 1999 (24.12.99)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau

List of designated Offices

15 December 2000 (15.12.00)

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR  
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZW

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Form PCT/IB/301 (July 1998)

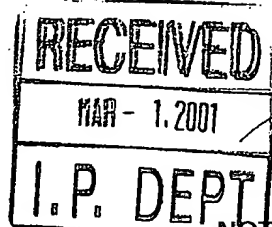
Authorized officer:

Masashi HONDA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003733837





WPBJD

PCT

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 21 February 2001 (21.02.01)	
Applicant's or agent's file reference 1267	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP00/08391	International filing date (day/month/year) 29 November 2000 (29.11.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 29 November 1999 (29.11.99)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
29 Nove 1999 (29.11.99)	11/338530	JP	29 Janu 2001 (29.01.01)
29 Nove 1999 (29.11.99)	11/338531	JP	29 Janu 2001 (29.01.01)
24 Dece 1999 (24.12.99)	11/368058	JP	29 Janu 2001 (29.01.01)
24 Dece 1999 (24.12.99)	11/368059	JP	29 Janu 2001 (29.01.01)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Magda BOUACHA

Telephone No. (41-22) 338.83.38



\_\_\_\_\_



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年6月7日 (07.06.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/39613 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08391

(22) 国際出願日: 2000年11月29日 (29.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平 11/338530 1999年11月29日 (29.11.1999) JP  
特願平 11/338531 1999年11月29日 (29.11.1999) JP  
特願平 11/368058 1999年12月24日 (24.12.1999) JP  
特願平 11/368059 1999年12月24日 (24.12.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田恵教 (OHTA,

Shigenori) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP). 斉藤知明 (SAITOH, Chiaki) [JP/JP]. 岩崎弘明 (IWASAKI, Hiroaki) [JP/JP]. 中川亜紀 (NAKAGAWA, Aki) [JP/JP]; 〒300-0398 茨城県稲敷郡阿見町阿見4041 協和醸酵工業株式会社 食品酒類研究所内 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF STRENGTHENING THE TASTE OF SODIUM CHLORIDE, AGENT FOR STRENGTHENING THE TASTE OF SODIUM CHLORIDE, SODIUM CHLORIDE-TASTE SEASONING AND FOOD HAVING STRENGTHENED TASTE OF SODIUM CHLORIDE

(54) 発明の名称: 食塩味増強方法、食塩味増強剤、食塩味調味料および食塩味増強食品

(57) Abstract: A method of strengthening the taste of sodium chloride in drinks or foods characterized by adding a peptide, which is prepared by hydrolyzing and deamidating an acidic peptide or a protein, to drinks or foods containing sodium chloride; an agent for strengthening the taste of sodium chloride which contains the above peptide as the active ingredient; a sodium chloride-taste seasoning which contains the above peptide and sodium chloride; and drinks or foods containing drinks or foods containing the above-described agent for strengthening the taste of sodium chloride or the above-described sodium chloride-taste seasoning.

(57) 要約:

本発明は、酸性ペプチドまたは蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを食塩含有飲食品に添加することを特徴とする飲食品の食塩味増強法、該ペプチドを有効成分として含有する食塩味増強剤、該ペプチドおよび食塩を含有する食塩味調味料、および該食塩味増強剤または食塩味調味料を添加してなる飲食品を添加してなる飲食品に関する。

WO 01/39613 A1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 明 細 書

### 食塩味増強方法、食塩味増強剤、食塩味調味料および食塩味増強食品

#### 技術分野

本発明は、食塩を含有する飲食品の食塩味増強方法ならびにそれに用いる食塩味増強剤および食塩味調味料に関する。また、該方法で得られる減塩飲食品に関する。

#### 背景技術

食塩（塩化ナトリウム）は、飲食品の調味や加工において、飲食品への味の賦与、飲食品の保存性の向上、飲食品の物性の改善等の重要な役割を果たしている。食塩は、特においしいと感じさせる味（食塩味）を飲食品に与え、その構成成分であるナトリウムと塩素は人体の必須栄養素である。

しかしながら、食塩の構成成分であるナトリウムの過剰摂取は、多数の健康問題、例えば高血圧等の心臓病や血管系疾患の危険因子となると考えられている。日本だけでなく先進諸国では、これらの疾患に罹り易い高齢者層の増加に伴い、食塩、特にナトリウムの摂取量の減少が強く望まれている。

食塩摂取量の減少のためには、飲食品の調味や加工において食塩の使用量を減少させることがもっとも単純な方法である。しかし、家庭の調理食品であれ、加工飲食品であれ、飲食品に含まれる食塩量を10%以上減少させると、その飲食品の美味しさは、一般に損なわれることになる。

食塩味を損なうことなく食塩、特にナトリウムの摂取量を減少させる方法、即ち一般に減塩方法と呼ばれているものとしては、それ自身食塩味を呈する物質（以下、食塩代替物質という。）を使用する方法と、それ自身食塩味を呈することはないが、食塩と共存させることによりその食塩味を増強する物質（以下、食塩味増強物質という。）を使用する方法等が知られている。

食塩代替物質としては、例えばカリウム塩、アンモニウム塩、塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸からなるペプチドおよびグルコン酸のアルカリ金属塩等が知られている。

カリウム塩は、食塩味の他に苦味を有し、特有の後味をもたらすという欠点

を有する。この問題を解決することを目的とするものとしては、塩基性アミノ酸二塩酸塩、グルタミン酸のカリウム塩またはアンモニウム塩および塩化カリウムからなる組成物や、乳糖ミネラルと塩化カリウムとの混合物や、グリシンエチルエステル塩酸塩またはトリプトファンエチルエステル塩酸塩と塩化カリウムとの組成物や、塩化カリウムとマグネシウム塩を主成分としさらにリジン塩酸塩等を含有する組成物や、塩化カリウム、食塩およびクエン酸塩からなりナトリウム／カリウム比が1以下である組成物等が知られている。

アンモニウム塩としては、例えばカリウム塩、アンモニウム塩および酸性コリン塩を含有する組成物や、食塩およびカプセル化されたアンモニウム塩を含有する組成物等が知られている。

塩基性アミノ酸に関しては、例えばリジンコハク酸塩、リジンコハク酸1水塩またはオルニチンアジピン酸一水塩を含有する組成物や、塩基性アミノ酸のコハク酸塩を含有する組成物や、塩基性アミノ酸塩酸塩、5'-ヌクレオチド、甘味成分およびクエン酸ナトリウムを含有する組成物や、リジンコハク酸塩等を含有する組成物等が知られている。

塩基性アミノ酸からなるペプチドとしては、例えばオルニチル- $\beta$ -アラニン、リジルグリシン、オルニチルグリシン、オルニチルタウリンおよびリジルタウリン等が知られている。

また、グルコン酸のアルカリ金属塩としては、グルコン酸のカリウム塩等が知られている。

食塩味増強物質は、食塩を代替することはできないが、食塩の食塩味を増強することにより食塩の使用量を減少させ、減塩を可能とする物質である。

食塩味増強物質としては、例えば分子量が50,000ダルトン以下のコラーゲンを加水分解して得られるペプチド（特開昭63-3766号）、甘味蛋白質であるソーマチン（特開昭63-137658号）、クエン酸生産能を有する黒麹菌で製麹した黒麹および黄麹菌で製麹した黄麹の混合物を消化分解して得られる分解液（特開平2-53456号）、陽イオン性界面活性剤であるセチルピリジウム塩単独またはセチルピリジウム塩とアルギニンやリジン等の塩基性アミノ酸との混合物（特表平3-502517号）、炭素数3～8の飽和脂肪族モノカルボン酸（特開平5-184326号）、塩基性アミノ酸であ

るアルギニンと酸性アミノ酸であるアスパラギン酸との等モル混合物（米国特許 5, 145, 707）、卵白蛋白質、ゼラチン、大豆蛋白質、小麦蛋白質、コーン蛋白質、魚蛋白質、乳蛋白質または肉蛋白質等の蛋白質加水分解物（特開平 7-289197 号）、トレハロース（特開平 10-66540 号）等が知られている。

蛋白質酵素分解物が食塩味増強作用を有することは、上記の特開昭 63-3766 号および特開平 7-289197 号に記載されている。特開昭 63-3766 号には、コラーゲン加水分解物が食塩味増強作用を有するが、この作用はコラーゲン加水分解物に特有の性質であり、大豆蛋白質や乳蛋白質の加水分解物にはないと記載されている。

前述の特開平 7-289197 号には、食塩味増強物質として蛋白質加水分解物を用いることが開示されているが、本発明の食塩味増強作用の活性成分は蛋白質の加水分解で生じるアルギニンおよびリジン等の遊離の塩基性アミノ酸であることが記載されている。

このように、減塩方法として食塩代替物質を使用する方法や、食塩味増強物質を使用する方法が数多く提案されている。しかし、嗜好性、効果、経済性、安全性等の点から未だ満足すべき減塩方法は開発されておらず、従って減塩食品は一般化していない。上記の問題点を解決した減塩方法が強く望まれている。

ペプチドの味に関しては数多くの研究がある。大豆分離蛋白質のペプシン分解物をキモトリプシンで処理したプラステイン反応生成物から、旨味を有するペプチドとしてグルタミン酸またはアスパラギン酸を含むジペプチドおよびトリペプチドが分離されている [Agr. Biol. Chem., 36, 1253 (1972)]。この結果は合成ペプチドを用いて確認されている [Agr. Biol. Chem., 37, 151 (1973)]。魚肉蛋白質濃縮物の酵素分解物から分子量 1,000 以下のペプチドが分画され、それはさらにイオン交換樹脂を用いて、酸性、中性および塩基性のペプチドに分画され、酸性のオリゴペプチド画分が旨味を有していることが明らかにされている [Agr. Biol. Chem., 37, 2891 (1973)]。さらに、この酸性オリゴペプチド画分の構成ペプチドが同定されている [J. Agric. Food. Chem., 23, 49 (1975)]。

低分子量の酸性ペプチドが食塩味を有するとのいくつかの報告がある。デリシヤスペプチドは牛肉のスープから発見された8個のアミノ酸からなる旨味ペプチドである。このペプチドの構造活性相関の研究の中で、塩基性のジペプチドと酸性のジペプチドとが食塩味を有することが見出されている [Agr. Biol. Chem., 53, 319 (1989)]。また、これらの酸性ペプチドおよび類似の酸性ペプチドとして、アスパラギン酸および／またはグルタミン酸からなる4種類のジペプチドおよび8種類のトリペプチドが旨味と共に食塩味を有することが明らかにされ、さらに、デリシヤスペプチドの構成部分ペプチドである5個のアミノ酸からなる酸性ペプチドも食塩味を有することが報告されている [Biosci. Biotech. Biochem., 59, 689 (1995)]。

蛋白質の酵素分解物中のペプチドが食塩味を有するとの報告もある。小麦蛋白質であるグルテンを蛋白質分解酵素アクチナーゼで処理し、さらにこの分解物を塩酸で脱アミドした後、分画して得た分子量500～1,000の画分が、甘味、酸味、苦味、収斂味および旨味と共に、食塩味を有することが報告されている。しかし、この画分を煮干だし汁に添加すると、旨味のみが有意に強くなるが、甘味や食塩味などの他の味には有意差は認められないことが報告されている [日本家政学会誌, 45, 615 (1994)]。

大豆蛋白質の酵素分解物から旨味ペプチドとして酸性ペプチドが分離され、その内のいくつかのペプチドは単独またはイノシン酸の存在下で食塩味を呈することが報告されている [Biosci. Biotech. Biochem., 63, 555 (1999)]。

また、酸性ペプチドがペプチドの苦味をマスキングするとの報告がある [J. Food Sci., 40, 367 (1975)]。

このように、ペプチドやその中の酸性ペプチドについてもそれら自身の呈味性や、それらが旨味、苦味等の他の味に及ぼす影響について数多くの研究があり、またペプチドは旨味や食塩味等を有し、苦味をマスキングすることが明らかになっている。しかし、蛋白質を加水分解処理および／または脱アミド処理して得られるペプチドを主成分とする蛋白質酵素分解物が食塩の食塩味を増強することは知られていない。食塩味を有するペプチドの食塩味増強作用に関して、食塩とオルニチル- $\beta$ -アラニンの混合溶液の食塩味の強さを評価したところ、それぞれの食塩味は独立に発現して混合溶液の食塩味の強さは相加性を

示し、相乗作用はないこと、即ち、オルニチル- $\beta$ -アラニンに食塩の食塩味を増強する作用はないことが明らかにされている [J. Agric. Food. Chem., 38, 25 (1990)]。

以上のように、酸性ペプチドが食塩味増強作用を有することについては知られていない。また、市販されている蛋白質を酵素分解して得られた調味料や栄養食品素材等の酵素加水分解物は食塩味増強作用を有していない。

### 発明の開示

本発明の目的は、食塩を含有する飲食品の食塩味増強方法ならびにそれに用いる食塩味増強剤および食塩味調味料を提供することにある。また、該方法で得られる減塩飲食品を提供することにある。

本発明者は、酸性ペプチドまたは蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドが、それ自身が食塩味を有しないが、食塩の有する食塩味を強める作用（以下、食塩味増強作用という）があることを見出して本発明を完成した。

本発明は、下記（１）～（４２）に関する。

（１）酸性ペプチドを食塩含有飲食品に添加することを特徴とする、飲食品の食塩味増強法。

（２）酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理して得られるものである、（１）記載の食塩味増強法。

（３）酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるものである、（１）記載の食塩味増強法。

（４）塩基性物質を添加する、（１）～（３）のいずれか記載の飲食品の食塩味増強法。

（５）塩基性物質が塩基性アミノ酸である、（４）記載の食塩味増強法。

（６）塩基性アミノ酸がアルギニンである、（５）記載の食塩味増強法。

（７）コハク酸を添加する、（１）～（６）のいずれかに記載の飲食品の食塩味増強法。

（８）酸性ペプチドを有効成分として含有する食塩味増強剤。

（９）酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理して得られるものである、（８）

記載の食塩味増強剤。

(10) 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるものである、(8) 記載の食塩味増強剤。

(11) 塩基性物質を含有する、(8) ~ (10) のいずれか記載の飲食品の食塩味増強剤。

(12) 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、(11) 記載の食塩味増強剤。

(13) 塩基性アミノ酸がアルギニンである、(12) 記載の食塩味増強剤。

(14) コハク酸を含有する、(8) ~ (13) のいずれかに記載の飲食品の食塩味増強剤。

(15) 酸性ペプチドおよび食塩を含有する食塩味調味料。

(16) 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理して得られるものである、(15) 記載の食塩味調味料。

(17) 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるものである、(15) 記載の食塩味調味料。

(18) 塩基性物質を含有する、(15) ~ (17) のいずれか記載の飲食品の食塩味調味料。

(19) 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、(18) 記載の食塩味調味料。

(20) 塩基性アミノ酸がアルギニンである、(19) 記載の食塩味調味料。

(21) コハク酸を含有する、(15) ~ (20) のいずれかに記載の食塩味調味料。

(22) (8) ~ (14) のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる飲食品。

(23) (8) ~ (14) のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる食塩含有飲食品。

(24) (15) ~ (21) のいずれに記載の食塩味調味料を添加してなる飲食品。

(25) 蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを食塩含有飲食品に添加することを特徴とする、飲食品の食塩味増強法。

(26) 塩基性物質を添加する、(25) 記載の飲食品の食塩味増強法。

(27) 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、(26) 記載の食塩味増強法。



(28) 塩基性アミノ酸がアルギニンである(27)記載の食塩味増強法。

(29) コハク酸を添加する、(25)～(28)のいずれかに記載の飲食品の食塩味増強法。

(30) 蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを有効成分として含有する食塩味増強剤。

(31) 塩基性物質を含有する、(30)記載の食塩味増強剤。

(32) 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、(31)記載の食塩味増強剤。

(33) 塩基性アミノ酸がアルギニンである、(32)記載の食塩味増強剤。

(34) コハク酸を含有する、(30)～(33)のいずれかに記載の食塩味増強剤。

(35) 蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドおよび食塩を含有する食塩味調味料。

(36) 塩基性物質を含有する、(35)記載の食塩味調味料。

(37) 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、(36)記載の食塩味調味料。

(38) 塩基性アミノ酸がアルギニンである、(37)記載の食塩味調味料。

(39) コハク酸を含有する、(35)～(38)のいずれかに記載の食塩味調味料。

(40) (30)～(34)のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる飲食品。

(41) (30)～(34)のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる食塩含有飲食品。

(42) (35)～(39)のいずれに記載の食塩味調味料を添加してなる飲食品。

本発明において酸性ペプチドとは、該ペプチドを構成するアミノ酸中の酸性アミノ酸数が塩基性アミノ酸数よりも多いペプチドをいう。酸性アミノ酸とは、アスパラギン酸およびグルタミン酸をいい、塩基性アミノ酸とは、リジン、アルギニンおよびヒスチジンをいう。

本発明の酸性ペプチドとしては、全アミノ酸数に対して酸性アミノ酸数が20%以上であることが好ましく、30%以上であることがさらに好ましい。全アミノ酸数に対して酸性アミノ酸数が20%以上である場合には、塩基性アミ

ノ酸数が15%以下であることが好ましく、10%以下であることがより好ましく、5%以下であることがさらに好ましい。また、全アミノ酸数に対して酸性アミノ酸数が30%以上である場合には、塩基性アミノ酸数が20%以下であることが好ましく、15%以下であることがより好ましく、10%以下であることがさらに好ましい。

酸性ペプチドの分子量は、400～30,000が好ましく、500～30,000がより好ましく、700～27,000が特に好ましい。ペプチド鎖長は、3～250が好ましく、4～250がより好ましく、6～230が特に好ましい。

酸性ペプチドは、ペプチド合成法により得ることもできるが、通常は蛋白質をエンドペプチダーゼ等を用いて加水分解し、必要に応じてさらに脱アミド処理することにより得ることができる。

分解処理に供する蛋白質の構成アミノ酸のうち、酸性アミノ酸数が塩基性アミノ酸数よりも多い場合、該蛋白質を加水分解することにより、酸性ペプチドを得ることができる。また、該蛋白質に脱アミド処理を行うと、該蛋白質中のアスパラギン残基およびグルタミン残基が、それぞれアスパラギン酸およびグルタミン酸残基となるため、さらに多くの酸性ペプチドを得ることができる。

分解処理に供する蛋白質の構成アミノ酸のうち、酸性アミノ酸数とアミド数の総数が塩基性アミノ酸数よりも多い場合は、該蛋白質を加水分解することに加え、脱アミド処理することにより、酸性ペプチドを得ることができる。

酸性アミノ酸数または酸性アミノ酸数とアミド数の総数が塩基性アミノ酸数よりも少ない蛋白質でも、該蛋白質を加水分解することにより、酸性ペプチドが生成される場合は、これを本発明の酸性ペプチドとして用いることができる。

本発明の加水分解処理および脱アミド処理に供する蛋白質としては、アミノ酸組成でアミドを持つ蛋白質であれば、いずれも用いられるが、蛋白質のアミノ酸組成で、酸性アミノ酸数が塩基性アミノ酸数よりも多い蛋白質が好ましい。また蛋白質のアミノ酸組成で、酸性アミノ酸数とアミド数の総数が塩基性アミノ酸数よりも多い蛋白質がより好ましい。また、酸性アミノ酸数とアミド数の総数としては全アミノ酸数の10%以上が好ましく、20%以上がより好ま

しく、30%以上が特に好ましい。

本発明でアミドとは、アスパラギンおよびグルタミンをいう。アスパラギンおよびグルタミンは脱アミド処理により、それぞれアスパラギン酸とグルタミン酸になる。

本発明の酸性ペプチド、または蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを得るため供せられる蛋白質としては、例えば小麦グルテン（単にグルテンともいう）、コーン蛋白質（ツエイン、グルテンミール等）、分離大豆蛋白質（単に大豆蛋白質ともいう）等の植物蛋白質、ミルクカゼイン（単にカゼインともいう）、ミルクホエイ蛋白質等の乳蛋白質、畜肉蛋白質、魚肉蛋白質等の筋肉蛋白質、卵白蛋白質、コラーゲン等の動物蛋白質や、微生物菌体蛋白質または微生物の生産するポリペプチド等の微生物蛋白質などがあげられる。

蛋白質のアミノ酸組成で、酸性アミノ酸数が塩基性アミノ酸数よりも多い蛋白質としては、例えば大豆蛋白質、乳蛋白質、畜肉蛋白質、魚肉蛋白質、卵白蛋白質等があげられる。蛋白質のアミノ酸組成で、酸性アミノ酸数とアミド数の総数が塩基性アミノ酸数よりも多い蛋白質としては、例えば小麦グルテン等があげられる。

また、酸性アミノ酸数とアミド数の総数が全アミノ酸数の30%以上の蛋白質としては、例えば小麦グルテンや分離大豆蛋白質等があげられる。酸性アミノ酸数とアミド数の総数が全アミノ酸数の20%以上30%未満の蛋白質としては、例えばミルクカゼインやミルクホエイ蛋白質、畜肉蛋白質、魚肉蛋白質、卵白蛋白質、コーン蛋白質等があげられる。酸性アミノ酸数とアミド数の総数が全アミノ酸数の10%以上20%未満の蛋白質としては、例えばコラーゲン等があげられる。

コラーゲンから得られるゼラチンも、本発明の蛋白質として使用できる。ゼラチンには酸処理により得られるゼラチン（タイプA）と、アルカリ処理により得られるゼラチン（タイプB）の二種類がある。両者ともに使用できるが、タイプBのゼラチンではアミド結合の大部分が分解されているので、脱アミド処理をすることなく使用することもできる。

蛋白質の加水分解処理は、酸、アルカリ等を用いる化学処理方法または蛋白

質加水分解酵素を用いる酵素処理方法等により行うことができるが、酵素処理法で行うのが好ましい。

蛋白質加水分解酵素としては、エンドペプチダーゼ（プロテイナーゼともいう）およびエキソペプチダーゼがあげられるが、エンドペプチダーゼを用いることが好ましい。

エンドペプチダーゼとしては、例えばトリプシン、キモトリプシン、ズブチリシン等のセリンプロテアーゼ、パパイン、プロメライン、フィシン等のチオールプロテアーゼ、ペプシン、キモシン等のカルボキシルプロテアーゼ、サモリシン等のメタルプロテアーゼ等があげられる。

エンドペプチダーゼとして市販されているものとしては、例えばペプシン、マルチフェクトP-3000（協和エンザイム社製）、ピオブラーゼ（長瀬産業社製）、アルカラーゼ（ノボ社製）等があげられる。

蛋白質加水分解酵素としてエキソペプチダーゼ活性を有するエンドペプチダーゼを使用すると、エキソペプチダーゼの作用により遊離のアミノ酸や低分子のペプチドに由来する旨味が生成したり苦味が減少するため、好ましい結果が得られる場合がある。

エキソペプチダーゼ活性を有する酵素としては、例えばスミチームFP（新日本化学社製）やアクチナーゼ（科研製薬社製）があげられる。

蛋白質加水分解酵素の使用量は、使用する酵素と蛋白質の種類等により異なるが、加水分解処理する蛋白質の0.05～8%（w/w）であることが好ましく、0.1～6%（w/w）であることがより好ましく、1～4%（w/w）であることが特に好ましい。

蛋白質の加水分解処理のpHや反応温度は、使用する酵素の最適条件またはそれに近い条件を採用することができる。反応条件は、最終的には得られる加水分解物の食塩味増強作用や味質を考慮して決定できる。蛋白質加水分解酵素の使用量、反応pH、反応温度、安定性等の情報は、酵素供給者から入手できる。

pHの調整は、塩酸、酢酸、乳酸、クエン酸またはリン酸のような任意の適当な飲食品に許容しうる酸、または水酸化ナトリウム、水酸化カリウムのような任意の適当な飲食品に許容しうるアルカリにより行うことができる。蛋白質



の加水分解処理時間は、使用する蛋白質加水分解酵素の種類、その使用量、温度、pH条件等で異なるが、1～100時間が好ましく、6～72時間がより好ましい。

加水分解処理終了後、反応液をそのまま次の処理に供することもできるが、加熱処理や酸処理により酵素を失活させた後に次の処理に供することもできる。

脱アミド処理工程について、以下に説明する。

脱アミド処理方法としては化学的方法と酵素を用いる処理方法があげられる。脱アミド処理反応は、前述の蛋白質加水分解処理前に行うこともできるし、蛋白質加水分解処理後に行うこともできる。また、蛋白質加水分解処理と同時に行うこともできる。

化学的な脱アミド方法は、公知の方法を用いることができる。一般的には蛋白質を酸で加熱処理する。酸としては、塩酸、硫酸等の無機酸および酢酸、乳酸等の有機酸があげられ、高い脱アミド率を目的とする場合には塩酸を使用するのが好ましい。塩酸を使用する脱アミド反応は、例えば、塩酸濃度は0.4～1.0 mol/L、温度は50～125℃、加熱時間は10～180分間で行うことができる。

具体的方法としては、例えばFood Technol., 15(3), 141 (1961)、J. Food Sci., 40, 1283 (1975)、J. Agric. Food Chem., 24, 504 (1974)、日本農芸化学会誌、55, 983 (1981)およびAgric. Biol. Chem., 49, 1251 (1985)等に記載の方法があげられる。

酸で脱アミド反応を行った場合には、反応終了後に中和剤等を用いて中和する必要がある。中和剤としては、水酸化ナトリウムが一般的に用いられるが、目的とする食塩味増強剤がナトリウムを含まないことを望むのであれば、水酸化カリウム等、飲食品加工に使用される他のアルカリ剤が用いられる。遊離の塩基性物質を中和剤の一部または全部に使用することもできる。遊離の塩基性物質としては、例えばアルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸があげられる。

酵素による脱アミド反応は、公知の方法で行うことができる。

第一の方法として、エンドペプチダーゼを用いる加水分解反応を用いる方法があげられる。本反応では、ペプチド結合の分解とともに脱アミド反応が進行

する。使用する酵素としては、例えばパパイン、トリプシン、パンクレアチン、アルカラーゼ（ノボ社製）、プロナーゼ（科研化学製）等があげられる。反応は、通常pH 8～11、10～75℃で6～48時間行う。

具体的方法としては、例えばAgric. Biol. Chem., 50, 1989 (1986)、J. Agric. Food Chem., 35, 224 (1987)、J. Agric. Food Chem., 35, 285 (1987)、J. Food Sci., 55, 127 (1990)、特開平3-91445号公報等に記載の方法があげられる。

第二の酵素的な方法として、ペプチド中のグルタミンのアミド結合を加水分解するペプチドグルタミナーゼ[Biochemistry, 10, 1222 (1971)]を使用する方法があげられる。この方法により、より高い脱アミド率が得られる。ペプチドグルタミナーゼでの処理は、蛋白質を加熱処理した後、または蛋白質を酵素により加水分解処理した後に行うと効率を向上させることができるので好ましい[J. Food Sci., 53, 1132 (1988)、J. Food Sci., 54, 598 (1989)、JAOCs, 68, 459 (1991) およびJ. Agric. Food Chem., 40, 719 (1992)]。

蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドの分子量は、400～30,000が好ましく、500～30,000がより好ましく、700～27,000が特に好ましい。ペプチド鎖長は、3～250が好ましく、4～250がより好ましく、6～230が特に好ましい。

蛋白質の脱アミド処理とそれに続く加水分解処理、あるいは加水分解処理とそれに続く脱アミド処理は、文献記載の方法[J. Cereal Sci., 21, 153 (1994) および日本家政学会誌, 45, 615 (1994)]に準じて行うこともできる。本発明の食塩味増強作用をもつ蛋白質加水分解物を取得するのに必要な脱アミド率は蛋白質中の酸性アミノ酸の含量とアミドの含量により異なるが、20%以上が好ましく、50%以上がより好ましく、80%以上が特に好ましい。

蛋白質を加水分解処理、および必要に応じて脱アミド処理して得られる溶液は、そのまま飲食品に添加したり、食塩味増強剤または食塩味調味料に用いてもよいが、該溶液を活性炭、限外濾過膜等による脱色処理、クロマトグラフィー、膜分離等による分離精製処理、減圧濃縮等による濃縮処理等をして得られる、脱色液、精製液、濃縮液等の液体、該液体を減圧乾燥、噴霧乾燥等、乾燥処理して得られる固形物、粉末等として、これを飲食品に添加したり食塩味増

強剤または食塩味調味料に用いてもよい。

塩基性物質は、蛋白質を加水分解処理、および必要に応じて脱アミド処理して得られるペプチドの食塩味増強作用をさらに強化する。該塩基性物質としては、飲食品に添加でき、ペプチドの食塩味増強作用を強化するものであれば特に制限が無く、例えば塩基性アミノ酸があげられる。

塩基性アミノ酸としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチン等があげられ、特にアルギニンが好ましい。塩基性物質は対象とする食品中の濃度が3～50 mmol/kg、好ましくは8～25 mmol/kgになるように使用する。アルギニンの場合には、0.04～0.9%、好ましくは0.15～0.4%である。

本発明のペプチドによる食塩味増強作用は、コハク酸によっても強化される。コハク酸は貝特有の味として知られている。コハク酸は、コハク酸特有の味が感じられない閾値濃度である0.02%以下の濃度でもその効果を発揮する。コハク酸は遊離酸または塩として対象とする食品中の濃度が0.001～0.1%、好ましくは0.005～0.03%になるように使用する。

本願発明の食塩味増強方法の対象となる飲食品としては、食塩を含有しない飲食品でも食塩を含有する飲食品でも、飲食時に食塩が含まれる食品であれば特に制限はない。飲食品としては、例えば味噌、醤油、たれ、だし、ドレッシング、マヨネーズ、トマトケチャップ等の調味料、お吸い物、コンソメスープ、卵スープ、ワカメスープ、フカヒレスープ、ポタージュ、みそ汁等のスープ類、麺類（そば、うどん、ラーメン、パスタ等）のつゆ、スープ、ソース類、おかゆ、雑炊、お茶漬け等の米調理食品、ハム、ソーセージ、チーズ等の畜産加工品、かまぼこ、干物、塩辛、珍味等の水産加工品、漬物等の野菜加工品、ポテトチップス、煎餅、クッキー等の菓子スナック類、煮物、揚げ物、焼き物、カレー等の調理食品等があげられる。

本発明の食塩味増強剤は、酸性ペプチドまたは蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを含有し、必要に応じて塩基性物質および/またはコハク酸を含有し、さらに必要に応じて無機塩、酸、アミノ酸類、核酸、糖類、賦形剤等の飲食品に使用可能な各種添加物を含有していてもよい。

また本発明の、食塩味調味料は、酸性ペプチドまたは蛋白質を加水分解処理

および脱アミド処理して得られるペプチドならびに食塩を含有し、必要に応じて塩基性物質および／またはコハク酸を含有し、さらに必要に応じて調味料、香辛料、無機塩、酸、アミノ酸類、核酸、糖類、賦形剤等の飲食品に使用可能な各種添加物を含有していてもよい。

無機塩としては、食塩、塩化カリウム、塩化アンモニウム等があげられる。酸としては、アスコルビン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、脂肪酸等のカルボン酸およびそれらの塩等があげられる。該塩としては、ナトリウムおよびカリウム塩があげられる。アミノ酸としては、グルタミン酸ナトリウム、グリシン等があげられる。核酸としてはイノシン酸ナトリウム、グアニル酸ナトリウム等があげられる。糖類としては、ショ糖、ブドウ糖、乳糖等があげられる。調味料としては醤油、味噌、エキス等の天然調味料、香辛料としては各種の香辛料があげられる。賦形剤としては澱粉加水分解物であるデキストリン、各種澱粉等があげられる。これらの使用量は、使用目的に応じて適宜設定することができるが、例えばペプチド100重量部に対して0.1～500重量部使用できる。

本発明において減塩飲食品とは、通常の食塩濃度に比べて食塩濃度が低い濃度の飲食品をいうが、一般には、食塩濃度が通常の食塩濃度の80% (w/w) 以下である飲食品をいう。通常の食塩濃度は、飲食品の種類、製品により異なるが、本願発明で適用される飲食品の食塩濃度は特に制限はない。

飲食品に使用する食塩味増強剤および食塩味調味料の量は、対象食品に対して酸性ペプチドとして0.01～1.5% (w/w)、好ましくは0.1～0.8% (w/w) である。蛋白質を分解して得られるペプチド混合物の場合には、原料蛋白質にもよるが通常はペプチドとして0.02～2.0% (w/w)、好ましくは0.2～1.0% (w/w) である。食塩味増強剤中に食塩が含まれ、その含量が高すぎる場合には脱塩処理により食塩含量を低下させてから使用する。脱塩処理は電気透析法や逆浸透法で行うことができる。

以下に、本発明において用いた分析法について示す。

#### 1. 蛋白質およびペプチドの定量法

蛋白質および加水分解物中のペプチドの量は全窒素 (T-N) の量より求めた。全窒素の定量はキエルダール法またはデュマ法により行った。平均ペプチ



ド鎖長を求める際の窒素量としては、全窒素量から下記に述べる方法で測定したアンモニア量を差し引いた値を用いた。蛋白質の量およびペプチド量は全窒素量に換算係数を掛けて求めた。換算係数はグルテンでは5.7を用い、他の蛋白質では6.25を用いた。

## 2. アミノ態窒素定量法

アミノ態窒素の定量は、トリニトロベンゼンスルホン酸を発色試薬とする比色法 [Agric. Biol. Chem., 50, 1217 (1986)] で行った。低分子のペプチドのみでなく高分子のペプチドも測定対象とするためトリクロロ酢酸による除蛋白質処理は省略した。標準物質としてロイシンを用いた。アンモニウムイオンもトリニトロベンゼンスルホン酸と反応して発色するため、硫酸アンモニウム標準溶液の吸光度と試料中のアンモニウムイオン濃度に基づき算出したアンモニウムイオンの吸光度を差引き、アミノ態窒素濃度を求めた。

## 3. アンモニア定量法

アンモニアの定量はデタミナー  $\text{NH}_3$  (協和メデックス社製) を用いる酵素法により行った。

## 4. 平均ペプチド長

平均ペプチド長は加水分解物中の全窒素量をアミノ態窒素の量で割って得た。

## 5. 脱アミド率

蛋白質中のアミド結合の脱アミド率 (%) は、蛋白質中のアミド態窒素に対する脱アミド反応により生成したアンモニア態窒素の割合で示した。蛋白質中のアミド態窒素は約1gの蛋白質を正確に秤量し、これを50mlの2mol/L塩酸中で、120℃で30分間加熱した後、生成するアンモニアを測定して求めた。

## 6. アミノ酸分析法

遊離アミノ酸はそのまま、蛋白質およびその加水分解物中のペプチドのアミノ酸組成は塩酸分解後、アミノ酸自動分析計で行った。

## 7. 酸性ペプチドの分画

ペプチド混合物からの酸性ペプチド画分は、イオン交換体としてSP-Sephacrose Fast Flow (ファルマシア バイオテック社製) を使用

したイオン交換クロマトグラフィーにより取得した。

## 8. 食塩濃度測定法

酵素加水分解処理および脱アミド処理に使用した水酸化ナトリウムの量と原料由来のナトリウムの量から酵素加水分解物中のナトリウム濃度を計算により求め、食塩濃度とした（計算法）。また、ナトリウムイオン選択電極（メトラートレド社製）により測定した（電極法）。両者の測定結果はほぼ一致していた。

## 9. 食塩味増強作用評価法1

食塩濃度を  $0.100 \text{ mol/L}$  に調整した試験物質溶液の食塩味を、 $0.100 \text{ mol/L}$  ( $0.58\% \text{ (w/v)}$ )、 $0.125 \text{ mol/L}$  ( $0.73\% \text{ (w/v)}$ )、 $0.150 \text{ mol/L}$  ( $0.88\% \text{ (w/v)}$ ) および  $0.175 \text{ mol/L}$  ( $1.02\% \text{ (w/v)}$ ) の食塩標準溶液の食塩味と比較し、どの標準食塩溶液の食塩味と同じかまたは近いのか、パネルにより第1表に示す評点法で食塩味増強物質の食塩味増強作用を評価した。パネルは飲食品の調味の専門家で構成した。

第1表

試験物質溶液の食塩味	評点
$0.100 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と同じか、それに近い。	0
$0.100 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と $0.125 \text{ mol/L}$ 食塩溶液の間と同じか、それに近い。	1
$0.125 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と同じか、それに近い。	2
$0.125 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と $0.150 \text{ mol/L}$ 食塩溶液の間と同じか、それに近い。	3
$0.150 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と同じか、それに近い。	4
$0.150 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と $0.175 \text{ mol/L}$ 食塩溶液の間と同じか、それに近い。	5
$0.175 \text{ mol/L}$ 食塩溶液と同じか、それに近い。	6

## 10. 食塩味増強作用評価法2（恒常刺激法）

食塩濃度を0.10mol/Lに調整したペプチド溶液を試験溶液とした。標準食塩溶液として、0.08mol/L、0.09mol/L、0.10mol/L、0.11mol/L、0.12mol/L、0.13mol/L、0.14mol/L、0.15mol/Lおよび0.16mol/Lの標準食塩溶液を調製した。これらの標準食塩溶液から試験溶液の食塩味の強さがほぼ中間になるように連続した5段階の標準溶液を選び、試験溶液の食塩味（恒常刺激にあたる）と比較し、どちらの食塩味が強いかわかる不等号または等号で表した。それぞれの標準食塩濃度について、標準溶液の食塩味を強いとしたパネルメンバーの全パネルメンバーに対する割合（以下、この割合を判断出現率という）と標準溶液の食塩味を弱いとしたパネルメンバーの全パネルメンバーに対する割合を求め、これらの数値を横軸の標準食塩濃度（恒常刺激の強さ）に対して正規確率紙にプロットし、試験溶液が強い割合と弱い割合についてそれぞれ直線を引いた。この2本の直線上で50%の判断出現率に対する2点の濃度の中間値が試験物質溶液の等価食塩濃度とした。なお、等価濃度は2本の直線の交点またはその近傍の濃度として得られる（佐藤信著、「統計的官能検査法」、第2版、304頁、1995年、日科技連出版社）。パネルは飲食品の調味の専門家12～15名で構成した。

以下に本発明の実施例を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

#### 実施例1

小麦グルテン粉末134g（T-N：118mg/g、アミド態窒素：1.88mmol/g、ウェストンフーズ社製）を0.6mol/L塩酸866mlに分散させ、オートクレーブ中120℃で2時間加熱し、脱アミドされたグルテン分散液910mlを得た。この分散液のpHを2mol/L水酸化ナトリウムで8.0に調整した後、蛋白質分解酵素マルチフェクトP-3000（協和エンザイム社製）6mlを加えて、40℃で20時間、加水分解反応を行った。反応中、2mol/L水酸化ナトリウムでpHを8.0に調整した。反応後、加水分解液に2mol/L塩酸を加えてpHを6.0に調整した後、

80℃で20分間加熱して酵素を失活させ、活性炭10gを添加して脱色し、濾過して、小麦グルテンを加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを有効成分とする食塩味増強作用を有するグルテン分解液1,200mlを得た。この分解液の窒素濃度は12.8g/L、食塩濃度は0.505mol/Lであった。

得られた分解液を用いて、第2表に示される組成の評価液を調製した。なお、評価液中のペプチド濃度は、分解液中のペプチド濃度の1/10倍、評価液中の食塩濃度は0.1mol/Lに、それぞれ調整した。

第2表

分解液 (ml)	1 mol/L NaCl (ml)	水 (ml)	合計 (ml)
100	50	850	1000

この溶液の食塩味増強作用を食塩味増強作用評価法1に従って評価したところ、評価液の食塩味は食塩濃度0.125mol/Lにほぼ等しく評点2であった。

食塩味増強作用評価法2で評価液の食塩味増強作用を評価したところ、等価食塩濃度は0.129mol/Lであった。

また、従来技術の中で食塩味増強作用ならびに味質の点から比較的评价の高いアルギニンとアスパラギン酸の等モル混合物（米国特許5,145,707号）を評価した。0.1mol/L食塩、0.02mol/Lアルギニンおよび0.02mol/Lアスパラギン酸を含有する水溶液を調製し、等価食塩濃度を評価した結果は、0.125mol/Lであった。アルギニンおよびアスパラギン酸濃度をさらに上昇させても等価食塩濃度の上昇は生じなかった。また、0.02mol/Lアルギニン（塩酸塩）および0.1mol/L食塩を含有する水溶液、ならびに0.02mol/Lアスパラギン酸（ナトリウム塩）および0.1mol/L食塩を含有する水溶液について、等価食塩濃度はそれぞれ0.116mol/Lおよび0.111mol/Lであった。

評価液中のアルギニン濃度は $0.012\text{ g/L}$ 、リジン濃度は $0.007\text{ g/L}$ 、アスパラギン酸濃度は $0.148\text{ g/L}$ であった。そこで、 $0.1\text{ mol/L}$ 食塩、 $0.012\text{ g/L}$ アルギニン、 $0.007\text{ g/L}$ リジンおよび $0.148\text{ g/L}$ アスパラギン酸を含有する水溶液を調製し、該水溶液の等価食塩濃度を評価した結果は $0.100\text{ mol/L}$ であった。

#### 実施例 2

小麦グルテン粉末 $134\text{ g}$ を実施例 1 と同様に処理して脱アミド処理されたグルテン分散液 $910\text{ ml}$ を得た。この分散液にアルギニン $42\text{ g}$ を加え、さらに $2\text{ mol/L}$ 水酸化ナトリウムで $\text{pH } 8.0$ とし、以降の処理は実施例 1 と同様に行い、蛋白質を脱アミド処理および酵素分解処理して得られるペプチドとアルギニンを有効成分とする食塩味増強作用を有するグルテン分解液 $1,100\text{ ml}$ を得た。この分解液の食塩濃度は $0.351\text{ mol/L}$ であり、分解液の遊離アミノ酸の分析結果からアルギニン濃度は $34.2\text{ g/L}$ であり、アルギニンを除く窒素量は $14.0\text{ g/L}$ であった。

得られた分解物を用いて、第 3 表に示される組成の評価液を調製した。なお、評価液中のペプチド濃度は、分解液中のペプチド濃度の $1/10$ 倍、評価液中の食塩濃度は $0.1\text{ mol/L}$ に、それぞれ調整した。

第 3 表

分解液 (ml)	$1\text{ mol/L}$ NaCl (ml)	水 (ml)	合計 (ml)
100	6.5	835	1000

この溶液の食塩味増強作用を食塩味増強作用評価法 1 で評価したところ、 $10$ 倍希釈液の食塩味は食塩濃度 $0.15\text{ mol/L}$ とほぼ同じで評点 4 であった。評価法 2 に従って評価したところ、評価液の等価食塩濃度は $0.149\text{ mol/L}$ であった。

本分解液とアルギニンを組合わせることによって食塩味増強作用が（分解液単独では、 $0.1\text{ mol/L}$ の食塩の食塩味が $0.125\text{ mol/L}$ に上昇し

たことから、0.025量を1倍として比較すると)、アルギニンを使用することにより約2倍に上昇した。

等価食塩濃度が0.125mol/Lである、0.1mol/L食塩、0.02mol/Lアルギニンおよび0.02mol/Lアスパラギン酸を含有する水溶液のアルギニン濃度は3.48g/Lであり、本評価液中のアルギニン濃度(3.42g/L)とほとんど同じである。このことから、評価液中の小麦グルテンを加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドはアルギニンと共に食塩味増強作用を発現する際にアスパラギン酸よりもはるかに優れていることを示している。

### 実施例3

分離大豆蛋白質(T-N:132mg/g、アミド態窒素:0.958mmol/g、不二製油社製)50gを水450mlに分散させ、50℃でアルカラゼを1ml加えてpH未調整のまま30分間反応させた後、6mol/L水酸化ナトリウムでpHを8に上昇させ、50℃で21時間反応させた。反応中、pHは8に維持した。反応後、6mol/L塩酸でpHを6.0に合わせ、85~90℃で20分間加熱して酵素を失活させた後、遠心分離と濾過を行って透明な分解液445mlを得た。全窒素濃度は13.10g/L、食塩濃度は0.177mol/Lであった。遊離アルギニン濃度は0.01g/L以下であった。なお脱アミド率は20%であった。評価法1で、10倍希釈した分解物の食塩味増強作用を評価したところ、アルギニンが存在しない場合には評点1、0.012mol/L濃度のアルギニンの存在下では評点2であった。

### 実施例4

アルカラゼ8mlを含む55℃の温水3,460mlに、グルテン532gを徐々に加え、温度を55℃に保ち、24時間反応させた。反応中、pHを6mol/L水酸化ナトリウムで7.0に調整した。得られた酵素分解液3,848mlから3,800mlをとり、濃塩酸226mlを加え、115℃で90分間加熱し、脱アミド処理を行った。処理液3,940mlを2等分し、一方には6mol/L水酸化ナトリウム218mlを加え、もう一方には6mol/L水酸化ナトリウム135mlとアルギニン85.5gとを加えて、そ

れぞれ中和液を得た。中和液にそれぞれ活性炭を34 g加えて脱色した後、濃縮して、それぞれ1,600 mlの塩味増強作用を有するペプチド溶液を得た。アルギニンを含有しないペプチド溶液（試料1）のペプチド濃度は94.6 g/L、食塩濃度は0.92 mol/Lであった。アルギニンを含有するペプチド溶液（試料2）のペプチド濃度は94.6 g/L、食塩濃度は0.62 mol/L、アルギニン濃度は50.0 g/Lであった。

食塩味増強作用評価法2に準じてこれらの食塩味増強作用を評価した。試料1は食塩濃度0.1 mol/L中、ペプチド濃度1%で等価食塩濃度は0.126 mol/Lであった。試料2はペプチド濃度0.4%で等価食塩濃度0.126 mol/L、0.8%で0.140 mol/L、1.0% (w/v) で0.156 mol/L、1.25% (w/v) で0.162 mol/Lであった。

試料2のペプチドを0.8%含む0.05 mol/L、0.10 mol/L、0.15 mol/Lおよび0.20 mol/Lの食塩溶液の等価食塩濃度は、それぞれ0.069 mol/L、0.140 mol/L、0.222 mol/Lおよび0.291 mol/Lであった。食塩溶液の塩味は、それぞれ1.38倍、1.40倍、1.48倍および1.46倍増強されたことになる。

#### 実施例5

小麦グルテン（T-N：118 mg/g、アミド態窒素：1.88 mmol/g、ウェストンフーズ製品）67 g、分離大豆蛋白質（T-N：132 mg/g、アミド態窒素：0.958 mmol/g、不二製油社製）60 g、カゼイン（T-N：133 mg/g、アミド態窒素：0.785 mmol/g、シグマ社製）50 gおよびツエイン（T-N：135 mg/g、アミド態窒素：1.62 mmol/g、シグマ社製）50 gを、それぞれ0.6 mol/L塩酸433 ml、440 ml、450 mlおよび450 mlに分散し、オートクレーブ中、120℃で120分間加熱して脱アミド処理を行った。脱アミド率は、グルテンと分離大豆蛋白質でそれぞれ約90%、カゼインとツエインでそれぞれ約100%であった。反応液を50℃まで冷却後、それぞれの反応液を6 mol/L水酸化ナトリウムでpH8.0に調整した後、蛋白質分解酵素アルカラーゼ（ノボ社製）1 mlを加え、50℃で20時間、加水分解処理を行

った。反応中、pHを6 mol/L水酸化ナトリウムで8.0に維持した。分解反応後、6 mol/L塩酸でpHを6.0に合わせ、85~90℃で20分間加熱して酵素を失活させた後、遠心分離と、上清に濁りがある場合には濾過を行って透明な分解液をそれぞれ415 ml、415 ml、498 mlおよび452 ml取得した。全窒素濃度は、それぞれ16.27 g/L、14.91 g/L、12.70 g/Lおよび10.99 g/Lで、食塩濃度は、それぞれ0.704 mol/L、0.774 mol/L、0.732 mol/Lおよび0.690 mol/Lであった。

評価液は、分解液の10倍希釈液に、食塩濃度がそれぞれ0.1 mol/Lになるように食塩を添加して調製した。

評価液の食塩味増強作用を評価法1で評価したところ、評点はそれぞれ2であった。

次にアルギニンを使用した場合の食塩味増強作用を評価法1で評価した。評価液として、ペプチド濃度が分解液中のペプチド濃度の1/10倍、食塩濃度が0.1 mol/L、アルギニン塩酸塩を用い、アルギニン濃度が0.012 mol/L (2.09 g/L) となるように調製した溶液を用いた。

それぞれの評価液について、アルギニン塩酸塩を使用した分解液の評点は4であった。この結果から広範囲の蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドが食塩味増強作用を持ち、アルギニンでその作用がさらに増強することが示された。

蛋白質を分解して得られるペプチドが食塩味増強作用を有し、この食塩味増強作用がアミド結合の分解から生じたアンモニウム塩と酸処理や酵素分解から生じた遊離アミノ酸によるものでないことを確認するため、分解物を高架橋度強酸性陽イオン交換樹脂で処理し、分解液中のアンモニウムイオンと遊離アミノ酸ならびに一部の低分子量のペプチドを除去した分解液を調製し、この食塩味増強作用を調べた。なお高架橋度強酸性陽イオン交換樹脂としてダイヤイオンSK116（三菱化学社製）を使用した。

分解液からのアンモニウムイオン、遊離アミノ酸および低分子量のペプチドの除去は以下の通り行った。イオン交換樹脂（H型）250 mlを充填したカラムに分解液50 mlを通塔した後、水を流し、流出液750 mlを得た。得



られた溶出液を濃縮し、pHを6 mol/L水酸化ナトリウムでpH 6.5に調整し、水を加えて100 mlとした。次にカラムに2 mol/Lアンモニアを流し、溶出液750 mlを得てそれを濃縮し、2 mol/L塩酸でpH 6.5に調整し、水を加えて100 mlにした。pH調整前のpHは6.5から7.2の範囲であった。分解液と流出液について、遊離アミノ酸濃度、アンモニア濃度、平均ペプチド長を求めた。

第4表に結果を示す。なお流出液と溶出液の濃度は分解液50 mlに換算して表示した。

第4表

	遊離アミノ酸(g/L)		アンモニア(mmol/L)		平均ペプチド長	
	分解液	流出液	分解液	流出液	分解液	流出液
グルテン	7.26	0.02	229	0.41	4.87	8.06
大豆蛋白	12.68	0.04	102	0.41	3.17	5.88
カゼイン	12.48	0.03	77	0.10	2.69	4.35
ツェイン	10.36	0.11	170	0.32	2.38	6.29

流出液の遊離アミノ酸とアンモニアの濃度は、分解液中の濃度の100分の1以下であり、ほとんどの遊離アミノ酸とアンモニア除去されていた。平均ペプチド長の変化から遊離アミノ酸と低分子量のペプチドは溶出液に、長いペプチドは流出液に分画されていることが判る。分解液の平均ペプチド長がエキソペプチダーゼによる通常の分解物の平均ペプチド長に比較してかなり低いのは、脱アミドのために塩酸加熱処理を受けているからである。

5倍に希釈した流出液と溶出液の食塩味増強作用を、0.012 mol/L濃度のアルギニンの存在下、評価法1で評価したところ、いずれの流出液も評点4であり、溶出液の評点は0であった。流出液と溶出液を同時に含む5倍希釈液の食塩味増強作用は分解液と同じで評点4であった。アルギニンを使用しない場合も流出液は評点2、溶出液は評点0、両者の組み合わせでは評点2と、同様の傾向を示した。

これらの結果から、分解液中の遊離アミノ酸とアンモニウム塩は分解物の食塩味増強作用の発現に必須ではないことが確認された。

各蛋白質の分解液 100 ml を、それぞれ透析チューブ（和光純薬社製、分画分子量 12,000～14,000）に注入し、流水にて 2 昼夜透析した。透析内液に蒸留水を加えてそれぞれ 200 ml にあわせた。このようにして調製した溶液中を用い、透析内液の遊離アミノ酸濃度、アンモニア濃度および平均ペプチド長を求めた。

結果を第 5 表に示す。なお、それぞれの濃度は分解液 100 ml に含まれる濃度と対応するように換算して表示した。

第 5 表

	遊離アミノ酸(g/L)	アンモニア(mmol/L)	平均ペプチド長
グルテン	0.03	2.08	22.1
大豆蛋白	0.02	0.98	7.9
カゼイン	0.01	0.58	6.7
ツェイン	0.01	1.14	11.3

透析により透析内液の遊離アミノ酸とアンモニアの濃度は分解液中の濃度の 1 % 以下に減少していた。

食塩味増強作用は食塩濃度を 0.1 mol/L に調整した透析内液 5 倍希釈液と、同時に対照として、同じ食塩濃度の分解液 10 倍希釈液について、評価法 1 により評価した。アルギニンが存在しない場合には透析内液希釈液も加水分解液希釈液も評点 2 でほぼ同等の増強作用を示し、アルギニンが存在する場合には何れの希釈液も評点 4 であり、ほぼ同等の増強作用を示した。この結果は、先のイオン交換樹脂による分画実験の結果と同様、遊離アミノ酸やアンモニウム塩が本発明の食塩味増強作用発現に必須の成分でないことを示している。また本透析実験の結果からは食塩味増強作用を発揮する有効成分は低分子ペプチドでないことを示している。透析内液そのものは、いずれも食塩味が感じられなかった。

原料蛋白質、分解液および透析内液を塩酸で分解し、それぞれのアミノ酸組成を測定し、全アミノ酸重量に対する酸性アミノ酸重量の比率（重量％）を求めた。

結果を第6表に示す。

第6表

	原料蛋白質中(重量%)	分解液中(重量%)	透析内液中(重量%)
グルテン	41.9	43.0	48.5
大豆蛋白	32.4	34.3	38.6
カゼイン	29.1	28.9	31.4
ツエイン	29.7	30.5	39.7

また、アミノ酸組成から全アミノ酸に対する酸性アミノ酸の比率（モル％）を求めた。

結果を第7表に示す。

第7表

	原料蛋白質中(モル%)	分解液中(モル%)	透析内液中(モル%)
グルテン	37.9	39.5	44.9
大豆蛋白	30.0	31.8	36.9
カゼイン	26.8	26.6	29.9
ツエイン	26.3	27.0	36.7

食塩味増強作用の活性を有する透析内液では、重量％およびモル％ともに原料蛋白質および分解液に比較して酸性アミノ酸の比率が高まり、酸性ペプチドの存在比率が高まっていることを示している。

食塩味増強作用を有するペプチドの分子量を求めるため、ゲル濾過をおこなった。試料はそれぞれの分解液を活性炭で脱色後、もとの分解液の2倍に濃縮し、脱塩して食塩を除去した濃縮分解液を使用した。脱塩はマイクロ・アシラ

イザー S 1 (旭化成工業社製) を使用する電気透析で行なった。ゲルとしては Superdex 75 Prep Grade (ファルマシア バイオテック社製) を使用した。ゲル濾過は  $0.02 \text{ mol/L}$  リン酸 -  $0.1 \text{ mol/L}$  食塩緩衝液 (pH 6.8) で緩衝化したカラム (ゲルベッド: 直径 5 cm、高さ 50 cm) で行った。あらかじめ標準物質として分子量 1,355 のビタミン B12 および分子量 6,500 から 67,000 の標準蛋白質を分画し溶出位置を測定し、分子量 2,300 未満、2,300 ~ 7,300 および 7,300 より次の 3 画分の溶出位置を求めた。食塩味増強作用の官能評価の対照として  $0.02 \text{ mol/L}$  リン酸 -  $0.1 \text{ mol/L}$  食塩緩衝液 (pH 6.8) を使用した。試料の量は 10 ml とした。

各画分の食塩味増強作用を官能評価した結果、4 種の蛋白質について、いずれの画分にも増強活性が認められ、活性ペプチドの分子量は広い範囲に及んでいた。また、試料中のペプチドの最大分子量は 27,000 ~ 30,000 であった。

#### 実施例 6

グルタミンを高濃度で含有する市販のペプチド製品を脱アミド処理を行って得られる処理液について、食塩味増強作用を調べた。

ペプチド製品としては、「グルタミン ペプチド WGE 80 GPN」および「グルタミン ペプチド WGE 80 GPU」(いずれも DMV インタナショナル社製) を使用した。「グルタミン ペプチド WGE 80 GPN」はグルタミンを 25% (w/w) 含み、平均分子量が 670 であり、500 未満の分子量のペプチドを 66% (w/w)、500 ~ 1,000 の分子量のペプチドを 19%、1,000 ~ 10,000 の分子量のペプチドを 15% (w/w) 含む。「グルタミン ペプチド WGE 80 GPU」はグルタミンを 29% (w/w) 含み、平均分子量が 6,700 であり、500 未満の分子量のペプチドを 14% (w/w)、500 ~ 1,000 の分子量のペプチドを 11% (w/w)、1,000 より大きな分子量のペプチドを 75% (w/w) 含む。また、「グルタミン ペプチド WGE 80 GPU」は 10,000 より大きな分子量のペプチドを 23% 含んでいる。

これらのペプチド製品を、それぞれペプチド濃度 10% となるように 0.6

5 mol/L 塩酸に溶解させ、115℃で90分間加熱して脱アミド反応させた後、反応液を6 mol/L 水酸化ナトリウムで中和した。

これらの中和液を用いて、食塩味増強作用を評価した。評価液としてペプチド0.4% (w/v)、食塩0.1 mol/L およびアルギニン0.012 mol/L を含有する水溶液を調製し、食塩0.1 mol/L およびアルギニン0.012 mol/L を含有する水溶液を対照液として塩味の強さを評価した。その結果、低分子量の「グルタミン ペプチド WGE 80 GPN」の脱アミド処理物の塩味は対照液の塩味と同じで増強作用は認められず、高分子量の「グルタミン ペプチド WGE 80 GPU」の脱アミド処理物の塩味は対照液の塩味より強く、増強作用が認められた。

#### 実施例 7

アルカラゼ8gを溶解した60℃の温水3,400mlにグルテン600gを分散させ、60℃で20時間反応させた。反応中、6 mol/L 水酸化ナトリウムでpHを7.0に保持した。次に温度を55℃に下げ、スミチームFP（新日本化学工業社製）1gを加え、10時間反応させ酵素分解液3,805mlを得た。この分解液3,780mlに濃塩酸280mlを加え、120℃で15分間加熱し、脱アミド処理を行った。処理液に6 mol/L 水酸化ナトリウムを490ml加えて中和させた後、活性炭を70gを加えて脱色させた。脱色して得られた溶液を濃縮し、濃縮液2,060mlを得た。

本濃縮液1,960mlにアルギニン172gとクエン酸1水塩72gを溶解し、アルギニンを含有する液状の食塩味増強剤2,130mlを得た。この組成は、ペプチド161g/L、アルギニン81g/L、食塩79g/Lであった。

また、濃縮液の一部を、熱風供給温度175～180℃、排風温度90℃で噴霧乾燥し、粉末状の食塩味増強剤を得た。この組成は、ペプチド38.0% (w/w)、アルギニン19.0% (w/w)、食塩16.9% (w/w) であった。この粉末の塩味増強作用を、ペプチドを0.4% (w/v) および0.6% (w/v) 含む0.1 mol/L 食塩溶液で評価したところ、等価食塩濃度はそれぞれ0.127 mol/L および0.135 mol/L であった。

#### 実施例 8

ペプチドを酸性画分と中性および塩基性の画分の2画分に分画し、それぞれの画分の食塩味増強作用とアミノ酸組成を調べた。

ペプチド混合物からの酸性ペプチド画分と中性および塩基性画分への分画はイオン交換クロマトグラフィーで実施した。イオン交換体としてSP-Sepharose Fast Flow (ファルマシア バイオテック社製)を使用した。

実施例4で取得したアルギニン含有しないペプチド溶液(試料1)および実施例5で分離大豆蛋白質から取得した分解液を分画試料とした。分離大豆蛋白質からの分解液は実施例4に準じて脱色し濃縮した。これらのペプチド溶液を濃縮後、脱塩処理を行なった。ペプチド濃度が約100g/LでpHが3.5となるように1mol/Lクエン酸溶液と水で調整し、70mlを0.02mol/Lクエン酸緩衝液(pH3.5)で緩衝化したイオン交換体のカラム(ゲルベッド:直径2.6cm、高さ26cm)に通塔した。次に同じ緩衝液を流し、最初の流出液110mlを除く300mlの流出液を酸性ペプチド画分とした。その後、0.02mol/Lリン酸緩衝液(pH8.8)と0.5mol/L食塩を含有する水溶液により吸着ペプチドを溶出し、溶出液300mlを中性および塩基性画分とした。それぞれの画分は6mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH7.0に調整した。中性および塩基性画分は約40mlに濃縮して脱塩した。

脱塩後の分解液および分画画分について遊離アミノ酸と、塩酸分解して全アミノ酸を測定し、それぞれのアミノ酸について全アミノ酸の値から遊離アミノ酸の値を差し引いて、ペプチドのアミノ酸組成を求めた。このアミノ酸組成から全アミノ酸に対する酸性アミノ酸および塩基性アミノ酸の比率(モル%)を求めた。

結果を第8表に示す。

第8表

	酸性アミノ酸	塩基性アミノ酸
グルテン：分解液	35.2	4.4
酸性画分	47.2	0.1>
中性および塩基性画分	18.8	31.2
大豆蛋白：分解液	27.5	15.6
酸性画分	33.8	3.4
中性および塩基性画分	16.4	34.7

第8表から明らかなように、それぞれの蛋白質について、酸性画分では分解液に比べて、酸性アミノ酸の比率が上昇し、塩基性アミノ酸の比率が低下した。中性および塩基性画分では分解液に比べて、酸性アミノ酸の比率が低下し、塩基性アミノ酸の比率が上昇した。

本試験結果での分解液の酸性アミノ酸比率が、実施例5の第7表に示されている酸性アミノ酸の比率よりも低いのは、酵素分解処理および酸による脱アミド処理で蛋白質中の酸性アミノ酸、特にアスパラギン酸の半分以上が遊離アミノ酸に変化していることが原因である。

分解液およびそれぞれの画分について、食塩味増強作用を比較した。分解液からはペプチド濃度が0.4% (w/v) で食塩濃度が0.1 mol/Lの評価液を作製した。それぞれの画分からは分解液換算で分解液の評価液と同じ希釈度で、食塩濃度が0.1 mol/Lの評価液を作製した。対照として0.1 mol/Lの食塩溶液を使用した。

これらの評価液の食塩味増強作用を評価したところ、食塩味増強作用は酸性画分に存在し、中性および塩基性画分には増強作用は認められなかった。

なお、分解液、酸性画分、中性および塩基性画分のいずれにおいても、食塩味は認められなかった。また、0.1 mol/L食塩および0.02 mol/Lクエン酸ナトリウムを含有する水溶液 (pH 7.0) の塩味の強さは0.1 mol/Lの食塩溶液と同じであり、上記結果に影響しないことを確認した。

## 実施例 9

実施例 1 および実施例 2 で取得した分解物を食塩味増強剤として、野菜風味スープに使用し、その食塩味増強作用を調べた。食塩を除いたスープミックスの配合を第 9 表に示す。

第 9 表

原 料	配合 (g)
グルタミン酸ソーダ	62.0
イソシン酸ソーダとグアニル酸ソーダの等量混合物	7.0
クエン酸三ナトリウム	4.0
グラニュー糖	69.0
セロリ末	0.2
ホワイトペッパー	6.0
ガーリック末	1.0
オニオン末	23.0
合 計	172.0

第 9 表に示される配合のスープミックスと食塩または分解物を熱水に溶解し、スープ 1 L を調製した。

試験区と配合量を第 10 表に示す。



第 10 表

試験区	スープミックス (g)	食塩 (g)	分解物 (ml)
対照 1	5. 0	10. 00	0
対照 2 (20%減塩)	5. 0	8. 00	0
対照 3 (30%減塩)	5. 0	7. 00	0
試料 1 : 実施例 1 の分解物 (20%減塩)	5. 0	4. 65	114
試料 2 : 実施例 2 の分解物 (20%減塩)	5. 0	5. 68	114
試料 3 : 実施例 2 の分解物 (30%減塩)	5. 0	4. 70	100

第 10 表における対照 1 のスープは、上記スープミックス 0.5% (w/v) および食塩 1% (w/v) となるよう調製した。また、試料 1～3 には、ペプチド量としてスープ中の食塩量とほぼ等量の分解物を含む。なお、原料由来のナトリウムは僅かであるので、その減塩率の数値への影響は無視した。

食塩味の強さの評価は、食品の官能評価で汎用される評点法で行い、食塩濃度 1% (w/v) のスープの食塩味の強さを 5 とする 7 段階評価法により行った。20%または 30%減塩し、本発明の食塩味増強剤を使用しないスープも調製し、塩味の強さの評価の対照とした。

20%減塩スープの食塩味について、10 名のパネルにより官能試験した結果を第 11 表に示す。なお、t 検定により対照 1 (食塩濃度 1% のスープ) と比較して 5% の危険率で有意差が認められた試験区の結果に \* 印をつけた。

第 1 1 表

試験区	食塩味
対照 1	5. 0
対照 2	3. 3 *
試料 1 : 実施例 1 の分解物 ( 2 0 % 減塩 )	4. 2
試料 2 : 実施例 2 の分解物 ( 2 0 % 減塩 )	6. 0 *

第 1 1 表に示されるとおり、試料 1 は 2 0 % 減塩の対照 2 と比較して明らかに食塩味が増強されていた。試料 2 は対照 1 よりも有意差のある明らかに強い食塩味をもっていた。なお、食塩味増強剤の使用は、食塩味以外のスープの味に大きな影響を与えなかった。

3 0 % 減塩スープの食塩味について、1 0 名のパネルにより官能試験した結果を第 1 2 表に示す。

第 1 2 表

試験区	食塩味
対照 1	5. 0
対照 3	3. 2 *
試料 3 実施例 2 の分解物 ( 3 0 % 減塩 )	4. 5

第 1 2 表に示されるとおり、実施例 2 の食塩味増強剤を使用して 3 0 % 減塩スープを作製した場合、食塩味は 3 0 % 減塩スープよりは、食塩味は強くなっていた。なお、本食塩味増強剤の使用は、食塩味以外のスープ味に大きな影響を与えなかった。

#### 実施例 1 0

実施例 9 記載の試料 3 のスープにコハク酸二ナトリウムを 0. 0 2 % ( w /

v) となるよう添加し、30%減塩スープ（試料4）を調製した。

30%減塩スープの食塩味について、14名のパネルにより官能試験した結果を第13表に示す。

第13表

試験区	食塩味
対照1	5.0
対照3	2.8*
試料4：実施例2の分解物と0.02%コハク酸二ナトリウム（30%減塩）	5.1

第13表に示されるとおり、0.02%コハク酸二ナトリウムの添加により、蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドの食塩味増強剤の作用が強化された。なお、本食塩増強剤の使用は、食塩味以外のスープの味に大きな影響を与えなかった。

#### 実施例11

実施例7で得られた液状の食塩味増強剤1,000mlに、食塩80gを加え、噴霧乾燥して食塩味増強調味料を得た。これはペプチドと食塩をほぼ等量含み、減塩食卓塩として使用できる。

#### 実施例12

実施例7で得られた粉末状の食塩味増強剤を味噌汁、めんつゆおよびラーメンスープにそれぞれ添加し、その食塩味増強作用を評価した。

味噌汁は、第14表に示される処方で調製した。なお、だし汁は、かつお節40gを熱水4Lに加えて得た。

第 1 4 表

試験区	配合	食塩量
対照 1	だし汁	950m l
	味噌	30 g 2.85 g
	食塩	7.15 g 7.15 g
	塩分	1.0% (10 g)
対照 2 (25%減塩)	だし汁	950m l
	味噌	30 g 2.85 g
	食塩	4.65 g 4.65 g
	塩分	0.75% (7.5 g)
試料 (25%減塩)	だし汁	950m l
	味噌	30 g 2.85 g
	食塩	1.98 g 1.98 g
	食塩味増強剤	15.79 g 2.67 g
	塩分	0.75% (7.5 g)

めんつゆは、第 1 5 表に示される処方で調製した。なお、だし汁は水 3 L に、煮干し 40 g、昆布 30 g および椎茸 15 g を入れて加熱し、沸騰しかけたら昆布を引き上げ、弱火にしてけずり節 50 g を入れ、椎茸が煮えるまで加熱して得た。醤油は減塩醤油（キッコーマン社製「減塩しょうゆ」）を使用した。

第 1 5 表

試験区	配合	食塩量
対照 1	だし汁	650m l
	みりん	100m l 醤油
	50m l	4.33 g
	食塩	6.07 g 6.07 g
	塩分	1.3% (10.4 g)
対照 2 (25%減塩)	だし汁	650m l
	みりん	100m l 醤油
	50m l	4.33 g
	食塩	3.47 g 3.47 g
	塩分	0.975% (7.8 g)
試料 (25%減塩)	だし汁	650m l
	みりん	100m l 醤油
	50m l	4.33 g
	食塩	1.33 g 1.33 g
	食塩味増強剤	12.63 g 2.14 g
	塩分	0.975% (7.8 g)

ラーメンスープは、第 1 6 表に示される処方で調製した。なお、豚骨エキスは、「香露清湯」(協和醗酵工業社製)を使用した。スープミックスは、グルタミン酸ナトリウム 100 g、WMP (イノシン酸ナトリウムとグアニル酸ナトリウムの等量混合物、協和醗酵工業社製) 4 g、上白糖 30 g、ペッパー 5 g、ジンジャー 3 g、オニオン 20 g、ガーリック 5 g およびメンマ末 2 g (いずれも粉末) からなる。醤油はめんつゆに使用したものと同一である。

第 16 表

試験区	配合	食塩量
対照 1	豚骨エキス 70m l スープミックス 3.5 g 醤油 30m l 2.6 g 食塩 10.4 g 10.4 g 塩分 1.3% (13 g)	
対照 2 (25%減塩)	豚骨エキス 70m l スープミックス 3.5 g 醤油 30m l 2.6 g 食塩 7.15 g 7.15 g 塩分 0.975% (9.75 g)	
試料 (25%減塩)	豚骨エキス 70m l スープミックス 3.5 g 醤油 30m l 2.6 g 食塩 4.48 g 4.48 g 食塩味増強剤 15.79 g 2.67 g 塩分 0.975% (9.75 g)	

評価結果を第 17 表に示す。減塩しない食品（対照 1）と本発明の食塩味増強剤を使用した 25%減塩食品の評点の間には、いずれの食品においても 5%の危険率で有意差は認められなかった。塩味以外の味については特に味噌汁とめんつゆについて、だし風味と旨味の向上が明らかに認められた。また、この結果は、食塩味増強作用評価法 2 で得られる等価食塩濃度により、減塩効果を予測できることを示している。

第 17 表

試験区	食塩味
対照 1	5 . 0
対照 2	2 . 5
試料：味噌汁	5 . 2
めんつゆ	5 . 1
ラーメンスープ	4 . 7

産業上の利用可能性

本発明により、食塩を含有する飲食品の食塩味増強方法ならびにそれに用いる食塩味増強剤および食塩味調味料が提供される。また、本発明により減塩飲食品が提供される。

## 請求の範囲

1. 酸性ペプチドを食塩含有飲食品に添加することを特徴とする、飲食品の食塩味増強法。
2. 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理して得られるものである、請求の範囲 1 記載の食塩味増強法。
3. 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるものである、請求の範囲 1 記載の食塩味増強法。
4. 塩基性物質を添加する、請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか記載の飲食品の食塩味増強法。
5. 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、請求の範囲 4 記載の食塩味増強法。
6. 塩基性アミノ酸がアルギニンである、請求の範囲 5 記載の食塩味増強法。
7. コハク酸を添加する、請求の範囲 1 ～ 6 のいずれかに記載の飲食品の食塩味増強法。
8. 酸性ペプチドを有効成分として含有する食塩味増強剤。
9. 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理して得られるものである、請求の範囲 8 記載の食塩味増強剤。
10. 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるものである、請求の範囲 8 記載の食塩味増強剤。
11. 塩基性物質を含有する、請求の範囲 8 ～ 10 のいずれか記載の飲食品の食塩味増強剤。
12. 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、請求の範囲 11 記載の食塩味増強剤。
13. 塩基性アミノ酸がアルギニンである、請求の範囲 12 記載の食塩味増強剤。
14. コハク酸を含有する、請求の範囲 8 ～ 13 のいずれかに記載の飲食品の食塩味増強剤。
15. 酸性ペプチドおよび食塩を含有する食塩味調味料。
16. 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理して得られるものである、請



求の範囲 1 5 記載の食塩味調味料。

17. 酸性ペプチドが蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるものである、請求の範囲 1 5 記載の食塩味調味料。

18. 塩基性物質を含有する、請求の範囲 1 5 ～ 1 7 のいずれか記載の飲食品の食塩味調味料。

19. 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、請求の範囲 1 8 記載の食塩味調味料。

20. 塩基性アミノ酸がアルギニンである、請求の範囲 1 9 記載の食塩味調味料。

21. コハク酸を含有する、請求の範囲 1 5 ～ 2 0 のいずれかに記載の食塩味調味料。

22. 請求の範囲 8 ～ 1 4 のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる飲食品。

23. 請求の範囲 8 ～ 1 4 のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる食塩含有飲食品。

24. 請求の範囲 1 5 ～ 2 1 のいずれに記載の食塩味調味料を添加してなる飲食品。

25. 蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを食塩含有飲食品に添加することを特徴とする、飲食品の食塩味増強法。

26. 塩基性物質を添加する、請求の範囲 2 5 記載の飲食品の食塩味増強法。

27. 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、請求の範囲 2 6 記載の食塩味増強法。

28. 塩基性アミノ酸がアルギニンである請求の範囲 2 7 記載の食塩味増強法。

29. コハク酸を添加する、請求の範囲 2 5 ～ 2 8 のいずれかに記載の飲食品の食塩味増強法。

30. 蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドを有効成分として含有する食塩味増強剤。

31. 塩基性物質を含有する、請求の範囲 3 0 記載の食塩味増強剤。

32. 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、請求の範囲 3 1 記載の食塩味増強剤。

33. 塩基性アミノ酸がアルギニンである、請求の範囲 3 2 記載の食塩味増強剤。

34. コハク酸を含有する、請求の範囲 3 0 ～ 3 3 のいずれかに記載の食塩味増強剤。

35. 蛋白質を加水分解処理および脱アミド処理して得られるペプチドおよび食塩を含有する食塩味調味料。

36. 塩基性物質を含有する、請求の範囲 3 5 記載の食塩味調味料。

37. 塩基性物質が塩基性アミノ酸である、請求の範囲 3 6 記載の食塩味調味料。

38. 塩基性アミノ酸がアルギニンである、請求の範囲 3 7 記載の食塩味調味料。

39. コハク酸を含有する、請求の範囲 3 5 ～ 3 8 のいずれかに記載の食塩味調味料。

40. 請求の範囲 3 0 ～ 3 4 のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる飲食品。

41. 請求の範囲 3 0 ～ 3 4 のいずれかに記載の食塩味増強剤を添加してなる食塩含有飲食品。

42. 請求の範囲 3 5 ～ 3 9 のいずれに記載の食塩味調味料を添加してなる飲食品。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08391

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 95/04481, A1 (KANEKAFUCHI CHEMICAL IND.), 16 February, 1995 (16.02.95) & JP, 7-289197, A	1-42
A	US, 5145707, A (Kraft General Foods, Inc.), 08 September, 1992 (08.09.92) (Family: none)	1-42
A	JP, 49-126854, A (Haruo OBI), 04 December, 1974 (04.12.74) (Family: none)	1-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 February, 2001 (20.02.01)

Date of mailing of the international search report  
27 February, 2001 (27.02.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/08391

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST771#(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 95/04481, A1 (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND.) 16.2月.1995 (16.02.95) &JP, 7-289197, A	1-42
A	US, 5145707, A (Kraft General Foods, Inc.,) 8.9月.1992 (08.09.92) ファミリーなし	1-42
A	JP, 49-126854, A (小尾靖夫) 4.12月.1974(04.12.74) ファミリーなし	1-42

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.02.01

国際調査報告の発送日

27.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 1 2 6 7	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/J P 0 0 / 0 8 3 9 1	国際出願日 (日.月.年) 2 9 . 1 1 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 9 . 1 1 . 9 9	
出願人(氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A23L 1/22, 1/237, 1/227, 1/39, 2/38, 2/52, 2/66, A23J 3/34, C12P 21/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 95/04481, A1 (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND.) 16.2月.1995 (16.02.95) &JP, 7-289197, A	1-42
A	US, 5145707, A (Kraft General Foods, Inc.,) 8.9月.1992 (08.09.92) ファミリーなし	1-42
A	JP, 49-126854, A (小尾靖夫) 4.12月.1974(04.12.74) ファミリーなし	1-42

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.02.01

国際調査報告の発送日

27.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below:

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application No. PCT/JP00/08391 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date: June 11, 2001

Full name of the translator Akiko Kikuchi

Signature of the translator *Akiko Kikuchi*

Post Office Address c/o Techlex Co., Ltd., 7-6, Koishikawa  
1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0002 Japan

